REVIEW ARTICLE

Proteomic-based Studies on Leishmania

Nasrin Amiri-Dashatan[1],
Mehdi Koushki[2],
Mostafa Rezaei Tavirani[3],
Nayebali Ahmadi[4]

[1] PhD Student in Applied Proteomics, Proteomics Research Center, School of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran
[2] PhD Student in Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Professor, Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran
[4] Professor, Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran

(Received October 3, 2017 ; Accepted February 5, 2018)

Abstract

Leishmania is a protozoan parasite responsible for significant morbidity and mortality worldwide. Protozoan parasites of the genus *leishmania* are found as promastigotes in the sandfly vector and as amastigotes in mammalian macrophages. Mechanisms controlling stage-regulated gene expression in these organisms are poorly understood. Gene regulation in *leishmania*, like other trypanosomatides, performs in posttranscriptional and posttranslational levels. However, the correlation between mRNA content and protein contents is poor in these parasites. The completion of the genome sequence of several species of *Leishmania* has had a significant effect on the pathogenesis researches of Leishmaniasis. The prevalence of parasites becoming resistant to anti- leishmania drugs is increasing in several parts of the world including Iran. As protein is the most important target for drugs in response to a variety of signals including drugs, so, it seems protein profiles in both of the sensitive and resistant leishmania parasites could greatly promise about the mechanisms of responses to antileishmanial drugs. Also, many studies have been carried out to determine the factors associated with *leishmania* infection as well as their molecular mechanisms. In such studies, the new proteomics technology has been of great value. In fact one of the main objectives of proteomics is to identify and discover the disease-related pathologies and novel drug targets. In the current review article, proteomics -based studies investigating *leishmania* spp. are introduced.

Keywords: *Leishmania*, Leishmaniasis, proteomics

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (163):173- 190 (Persian).

* **Corresponding Author: Nayebali Ahmadi -** Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Tehran, Iran (E-mail: nayebalia@sbmu.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

مـــروری

مجـلـــه دانـشـــگاه عـلـــوم پـزشـــکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۳ مرداد سال ۱۳۹۷ (۱۹۰-۱۷۳)

مروری بر مطالعات مبتنی بر تکنولوژی پروتئومیکس در زمینه تحقیقاتی *لیشمانیا*

نسرین امیری داش آتان[۱]
مهدی کوشکی[۲]
مصطفی رضایی طاویرانی[۳]
نایبعلی احمدی[۴]

چکیده

لیشمانیا تک یاخته‌ای از خانواده تریپانوزوماتیده می‌باشد و طیف وسیعی از بیماری‌ها با علائم کلینیکی گسترده در انسان را ایجاد می نماید. انگل *لیشمانیا* دارای دو فرم پروماستیگوت در ناقل و فرم آماستیگوت در میزبان پستاندار می‌باشد. مکانیسم های کنترل و تنظیم بیان ژن در مراحل مختلف چرخه زندگی انگل به طور کامل شناخته نشده است. انگل *لیشمانیا* دارای تنظیم بیان ژن در مراحل پس از رونویسی و پس از ترجمه می باشد و ارتباط ضعیفی ما بین محتوای ترانسکریپتوم و پروتئوم در این ارگانیسم وجود دارد. تکمیل توالی ژنومیکی چندین گونه از *لیشمانیا*، در روند مطالعات پاتوژنز *لیشمانیا* تاثیر به‌سزایی داشته است. از طرفی ظهور موارد مقاوم به دارو در سطح جهان، منجمله کشور ایران رو به افزایش است. ترکیبی از منابع ژنومیکی در دسترس این انگل ها و تکنولوژی نوظهور پروتئومیکس توانسته است موجب روشن شدن جنبه های متعدد از بیولوژی *لیشمانیا* و هم‌چنین مکانیسم‌های درگیر در پاتولوژنز این بیماری گردد. رویکردهای پروتئومیکی متعددی برای توصیف و طبقه بندی پروفایل پروتئینی گونه‌های *لیشمانیا* مورد استفاده قرار گرفته است و با مشخص شدن تغییرات بیان پروتئین در طول تکامل انگل، ارزیابی برهم کنش انگل- میزبان و مکانیسم های مقاومت دارویی موجود در انگل را هموار ساخته است است. در مطالعات مرتبط با جوانب مختلف بیماری لیشمانیوزیس، تکنولوژی پروتئومیکس از ارزش بسیار بالایی برخوردار می باشد که در واقع یکی از اهداف اصلی مطالعات پروتئومیکی، شناسایی و کشف پاتوژنز مربوط به بیماری و معرفی اهداف جدید دارویی است. در این مطالعه مروری، به بررسی مطالعات پروتئومیکی به کار رفته جهت مطالعه انگل لیشمانیا پرداخته شد.

واژه های کلیدی: *لیشمانیا*، لیشمانیوز، پروتئومیکس

مقدمه

یکی از اهداف اساسی در تحقیقات پروتئومیک، فراهم آوردن اطلاعاتی جهت تشخیص زود هنگام و درمان موثر بیماری‌ها با درک بهتر از فیزیولوژی و پاتولوژی آن‌ها است. در کنار این تحقیقات، پیشرفت‌های اخیر در زمینه بیوانفورماتیک باعث رشد سریع در تجزیه و تحلیل، و جمع‌آوری بسیاری از داده‌های بیولوژیکی شده است. استفاده از ابزار پروتئومیکس در زمینه‌های گوناگون پزشکی انقلابی به پا کرده است و در زمینه

مولف مسئول: نایبعلی احمدی- تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس E-mail: nayebalia@sbmu.ac.ir
۱. دانشجوی دکتری پروتئومیکس کاربردی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. استاد، گروه علوم پایه، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴. استاد، گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۷/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۷/۱۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۱۱/۱۶

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

شناسایی بیومارکرهای تشخیص بیماری‌ها به‌طور غیر تهاجمی در مایعات بیولوژیک، مشارکت بسیار پر رنگی دارد. *لیشمانیا* انگل پروتوزوئری است که بیماری لیشمانیازیس با طیف گسترده‌ای از علائم بالینی را ایجاد می‌نماید. این بیماری مشکل بهداشتی و اقتصادی- اجتماعی در بسیاری از مناطق دنیا بوده به‌طوری‌که در ۹۸ کشور جهان به صورت اندمیک دیده می‌شود(۱). بیش از ۳۵۰ میلیون نفر، در مناطق با خطر ابتلا به این بیماری می‌باشند. تعداد موارد لیشمانیازیس در سراسر جهان ۱۲ میلیون برآورد شده است و حدود ۱/۶ میلیون مورد جدید از این بیماری سالانه گزارش می‌شود(۲). به دلیل اهمیت این بیماری، همواره سازمان بهداشت جهانی به این بیماری توجه ویژه‌ای داشته است. لیشمانیوز انسانی شامل گستره‌ای از بیماری‌ها شامل لیشمانیوز پوستی[1] (CL) بدون علائم و یا خود به خود محدود شونده تا فرم لیشمانیوز احشایی[2] (VL) با علائم ناتوان کننده با مرگ و میر بالا، می‌باشد(۳). تکنولوژی نو ظهور پروتئومیکس در زمینه مطالعه جوانب مختلف انگل *لیشمانیا* در ابتدای راه است و می‌تواند با استفاده از آنالیز همزمان مقادیر زیادی از مولکول‌های متنوع در زمینه لیشمانیازیس، پروفایل بیان پروتئین در انگل *لیشمانیا*، پروفایل پروتئینی در تعامل مابین انگل- میزبان و الگوی بیان پروتئین در نمونه‌های بیمار، به شناسایی و معرفی اهداف بالقوه درمانی جدید و مطالعه تاثیرات دارویی بر مسیرهای متابولیک انگل منجر گردد. تحقیقات پروتئومیک در این زمینه با مطالعه پروفایل پروتئینی گونه‌های مختلف انگل *لیشمانیا* شروع شده است و تفاوت‌های آشکاری بین پروفایل بیان پروتئین در گونه‌های مختلف شناسایی شده‌اند. هدف هدف از این مطالعه مروری، معرفی تکنولوژی پروتئومیکس و چشم انداز آن، در مطالعه جنبه‌های گوناگون انگل *لیشمانیا* و بیماری‌های لیشمانیازیس است.

1. Cutaneous leishmaniasis
2. Visceral leishmaniasis

پروتئومیکس

پیشرفت‌های اخیر در تکنولوژی‌های اومیکی[3] همانند پروتئومیکس، امکان شناسایی و توصیف مسیرهای بیولوژیکی جدید را در انگل *لیشمانیا* و هم‌چنین در میزبان انسانی مهیا نموده است که بسیار کارامدتر از مطالعات مولکولی می‌باشد. پروتئوم به عنوان تمام پروتئین‌های بیان شده توسط ژنوم، یک ارگانیسم یا یک نوع سلول تعریف می‌شود و پروتئومیکس در واقع مطالعه پروتئوم یک رده سلولی، بافت یا یک ارگانیسم با هدف بررسی و جستجوی یکپارچه فرایندهای بیولوژیکی می‌باشد. در واقع واژه پروتئومیکس اشاره به قلمرو وسیعی از مطالعات شامل جداسازی پروتئین‌های یک نمونه پیچیده و مقایسه پروفایل بیان پروتئین در نمونه‌های مختلف (برای مثال نمونه نرمال در مقابل سلول ترانسفورم شده) و حتی مطالعه تغییرات پس از ترجمه در اثر داروهای مختلف و یا دیگر محرک‌ها دارد. استفاده از ابزارهای پروتئومیکس در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی از جمله شناسایی بیومارکرهای بیماری‌های مختلف جهت تشخیص زود هنگام بیماری‌ها، انقلاب بزرگی ایجاد کرده است(۶-۴). هم‌چنین تکنیک‌هایی با توان بالا که توانایی پردازش و آنالیز مقادیر زیادی از مولکول‌های متنوع را دارد، محققان را در شناسایی مولکول‌های درگیر در فرایند بیماری‌های ایجاد شده با انگل *لیشمانیا*، مطالعه مقاومت انگل و همچنین توصیف اهداف شیمی درمانی جدید، توانمند ساخته است و اطلاعات بیولوژیکی گستره وسیعی از ژنوم تا بیان پروتئین را در بردارد(۷). اگر چه داده‌های ژنومیکی با اتمام پروژه ژنوم انسانی بسیار ارزشمند می‌باشند ولی به دلیل این که توالی ژنوم تصویر ایستایی از عملکرد سلول می‌باشد، از پاسخگویی به تمام سوالات بیولوژیکی ناتوان است. از طرفی بسیاری از مطالعات بر این نکته دلالت دارند که همه ژن ها بیان

3. *Omics*

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

نمی‌شوند و بین میزان mRNA[1] و بیان پروتئین ارتباط ضعیفی وجود دارد. همچنین تغییرات پس از ترجمه نیز تنها با مطالعات ژنومیکی قابل تفسیر نیستند و همین امر، باعث تقویت این عقیده شده است که پروتئومیک ابزاری با توان بالا جهت توصیف مولکول‌ها و مسیرهای بیان شده در انگل و همچنین بی مهرگان و میزبان انگل می‌باشد(۸). البته لازم به ذکر است که چالش‌هایی مانند تنوع بالای پروتئین‌ها در مقایسه با ژن‌ها، عدم توصیف کامل عملکردهای پروتئین فقط از روی توالی اسیدهای آمینه و ساختار سه بعدی آن‌ها، پیش روی مطالعات پروتئومیکی قرار دارند. لیشمانیازیس یک مشکل بهداشتی در سطح جهان بوده و با توجه به آمار بالای مبتلایان به این بیماری، تحقیقات پروتئومیکی در این حیطه امری ضروری می‌باشد و در بسیاری از زمینه‌ها از جمله مطالعات مقاومت دارویی و شناسایی اهداف درمانی جدید می‌تواند راهگشا باشد. مراحل انجام تحقیقات پروتئومیک در مورد انگل *لیشمانیا* به طور شماتیک در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.

تکنیک های پروتئومیکس

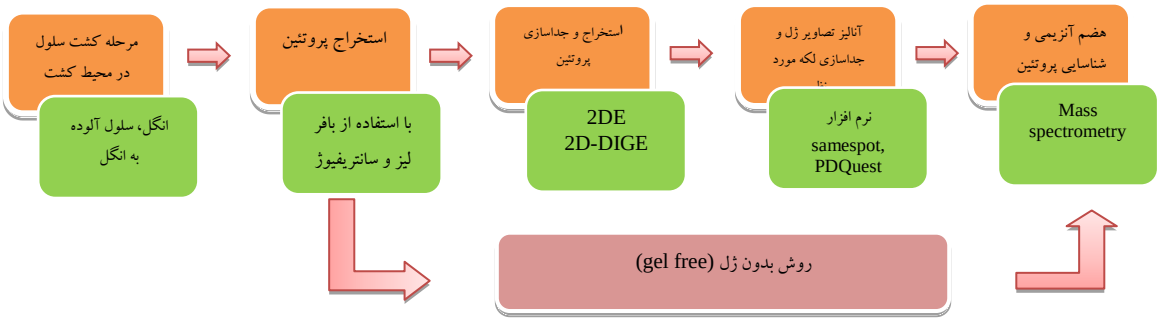
در طی سال های گذشته روش‌های زیادی برای آنالیزهای پروتئومیکی ارائه شده‌اند. یکی از اهداف عمده در مطالعات پروتئومیک شناسایی پروتئین‌های مورد نظر به وسیله توالی آمینو اسیدی شان می‌باشد. از پرکاربرد ترین این روش‌ها می‌توان ژل الکتروفورز دو بعدی (2DE) [2]، یونیزاسیون/واجذبی لیزری به کمک سطح (SELDI) [3]، کروماتوگرافی مایع/ طیف سنجی جرمی (LC-MS) [4]، ردیابی واکنش انتخاب شده (SRM)[5]، ردیابی چندین واکنش (MRM) [6] و آرایه‌های پروتئینی [7] نام برد. مرحله نخست در آنالیز پروتئوم، جداسازی پروتئین‌های موجود در نمونه‌ها است.

1. Messenger RNA
2. Two dimensional electrophoresis
3. SELDI [Surface- enhanced laser desorption/ionization]
4. liquid chromatography-mass spectrometry
5. selected reaction monitoring
6. multiple reaction monitoring
7. Protein arrays

الکتروفورز دو بعدی به عنوان یکی از رایج ترین روش‌های جداسازی در این زمینه مطرح است(۹). الکتروفورز دو بعدی ترکیب ایزوالکتریک فوکوسینگ (IEF) [8] در بعد اول و SDS-PAGE [9] در بعد دوم است که امکان جداسازی پروتئین‌ها را براساس بار و اندازه فراهم می‌کند. در دهه‌های گذشته برای انجام بعد اول، از آمفولیت‌های حامل سنتزی استفاده می شد که به دلیل عدم تکرار پذیری در ترکیب اجزای سنتز شده و ایجاد اثر الکترو اندوسمز، امروزه ژل‌های گرادیان pH تثبیت شده (IPG)[10] مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۰). پس از انجام الکتروفورز دو بعدی در اغلب موارد، به چند صد پروتئین روی ژل تفکیک می‌شوند و به دلیل بی رنگ بودن پروتئین‌ها لازم است آن‌ها را رنگ‌آمیزی و آشکار نمود که پس از رنگ‌آمیزی هر پروتئین به صورت یک لکه روی ژل دیده شود. از عمده روش‌های موجود برای رنگ آمیزی پروتئین ها در روش الکتروفورز دو بعدی، رنگ‌آمیزی کوماسی بلو، رنگ‌آمیزی نقره و رنگ‌آمیزی با رنگ های فلورسنت (sypro orange, sypro Red, sypro Ruby) می‌باشد(۱۲،۱۱). در روش الکتروفورز دو بعدی، تفاوت فلورسانس [11] پروتئین های موجود در نمونه زیستی (سالم و بیمار) با برچسب های فلورسنت متفاوتی نشان دار می‌شوند و پس از انجام الکتروفورز دو بعدی، از روی ترکیب رنگ لکه ها می‌توان به میزان بیان پروتئین‌ها در هر یک از نمونه ها پی برد (۱۳). از دیگر روش‌های جداسازی پروتئین‌ها که همان اهداف را تامین می‌کنند می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی هم‌چون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی تمایلی اشاره کرد که روش‌های سریعی برای جداسازی می‌باشند. این تکنیک‌ها ابزارهای متناوبی را جهت مطالعه پروتئین‌ها فراهم آورده‌اند و

8. isoelectric focusing
9. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
10. immobilized pH gradient
11. 2D-DIGE [2D- Fluorescence difference gel electrophoresis]

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]



تصویر شماره ۱: خلاصه روند کار آنالیز پروتئومیکی انگل و سلول آلوده به *لیشمانیا*

مشکلات کم‌تری نسبت به روش‌های بر پایه ژل دارا می‌باشند(۱۴). روش‌های یونیزه کردن و آزاد سازی لیزری به کمک ماتریس- زمان پرواز (MALDI-TOF-MS) Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry و یونیزاسیون با الکترواسپری (ESI) که در سال ۱۹۹۸معرفی شدند، امکان یونیزاسیون و شناسایی سریع پروتئین‌ها و پپتیدها را فراهم کرده‌اند. اساس طیف‌سنجی جرمی اندازه‌گیری نسبت جرم به بار (m/z) یون‌ها یا آنالیت‌ها در فاز گازی است. در روش MALDI، آنالیت با یک ماتریکس شیمیایی حاوی یک مولکول آلی کوچک دارای کروموفور، مخلوط می‌شود و سپس فوتون‌های لیزر نیتروژن (به طور معمول ۳۳۷ nm) تابانده می‌شوند. با تابش فوتون‌های لیزر، آنالیت تبخیر شده و به یون‌های فاز گازی تبدیل می‌گردد. یون‌های گازی توسط تفکیک‌کننده زمان پرواز از یکدیگر جدا شده، به وسیله آشکارساز تشخیص داده می‌شود و به صورت طیف اسپکترومتری جرمی ثبت می‌گردد(۱۵). بر خلاف یونیزاسیون MALDI-TOF که روی یک ماتریکس جامد انجام می‌شود، در روش یونیزاسیون الکترواسپری (ESI) [1] آنالیت به‌طور مستقیم در محلول پروتئینی با اسپری شدن و حذف حلال یونیزه می‌شود(۱۶). پس از به دست آوردن طیف مربوطه، داده‌ها با بانک اطلاعاتی پروتئین‌ها به منظور تطبیق وزن‌های مولکولی بر اساس الگوریتم‌های نمره‌دهی مقایسه می‌شوند(۱۷). این روش تجزیه‌ای که از روی میزان انطباق جرم پپتیدهای موجود در طیف اسپکترومتری جرمی و جرم پپتیدهای پروتئین‌های موجود در بانک اطلاعاتی تمام این پروتئین‌ها را نمره‌دهی کرده، پروتئین‌ها را براساس نمره لیست می‌کند و به عنوان انگشت نگاری جرمی پپتید (PMF) [2] شناخته می‌شود. روش کروماتوگرافی مایع-طیف سنجی جرمی را می‌توان به صورت چند بعدی نیز انجام داد. اگرچه روش‌های نقشه برداری پپتیدی سنتی قابلیت فراوانی در شناسایی پروتئین دارند ولی در استفاده از بانک های اطلاعاتی و همچنین به دلیل وجود پیچیدگی مخلوط پروتئینی، دارای محدودیت می‌باشند. روش طیف‌سنجی جرمی متوالی که اخیرا گسترش پیدا کرده است، راه حلی را برای این کاستی‌ها فراهم آورده است. در این روش تفکیک‌کننده‌ها ابتدا یک یون پپتیدی خاصی را براساس جرم به بار (m/z) آن انتخاب و سپس در تفکیک کننده‌های بعدی، این یون خاص بر اثر برخورد با مولکول‌های یک گاز بی‌اثر مثل آرگون به ذرات خنثی و یونی کوچک قطعه قطعه می‌شود. این تکنیک‌ها شامل یونیزاسیون MALDI و ESI جفت شده با روش‌های قطعه قطعه سازی مختلف مانند آنالیزورهای زمان پرواز و دام یونی می‌باشند(۱۸). گذشته از این پیشرفت‌ها، آنالیزهای کمی بیان پروتئین در طیف سنجی بدون استفاده از ژل پس از معرفی روش‌های برچسب‌های تمایلی نشان‌دار شده با ایزوتوپ ICAT [3] و برچسب‌های

1. Electrospray ionization

2. Peptide mass fingerprinting
3. Isotope Coded Affinity Tag

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

هم بار برای کمی‌سازی مطلق و نسبی iTRAQ[1] امکان‌پذیر شده است(۲۰،۱۹).

روش یونیزاسیون و آزادسازی لیزری تقویت شده به‌کمک سطح (SELDI)، روشی دیگر بر پایه طیف‌سنجی جرمی بوده و کاربردهای متعددی در آزمایش‌های کلینیکی پروتئومیکی دارد. اساس کار یونیزاسیون و آزاد سازی لیزری تقویت شده به کمک سطح، بر پایه واکنش انتخابی پلی پپتیدها با سطوح مختلف آرایه، به منظور جداسازی نمونه‌های زیستی و کاهش پیچیدگی آن‌ها قبل از آنالیز MALDI-MS می‌باشد(۲۱).

ردیابی واکنش انتخاب شده نیز روشی بر اساس طیف سنجی جرمی برای آنالیز کمی پروتئین‌های خاص می‌باشد. روش‌های SRM و MRM امکان شناسایی پروتئین‌هایی با مقدار کم در یک مخلوط پیچیده را فراهم می‌کنند. ردیابی واکنش انتخاب شده هم‌چنین به عنوان روشی جایگزین رویکردهایی بر پایه آنتی‌بادی برای تأیید بیومارکر ها معرفی شده است. در مقایسه با روش‌های صحبت شده، ریز آرایه‌های پروتئینی امکان شناسایی پروتئین‌های خاص را بدون استفاده از طیف سنجی جرمی در رویکرد پروتئومیکس هدف دار (targeted proteomics) فراهم می‌کنند. در این روش، آنتی‌بادی‌ها یا آنتی ژن‌های خاص روی یک سطح قرار گرفته تا امکان شناسایی چندین پروتئین را فراهم کنند. نمونه روی سطح آرایه قرار می‌گیرد و آنتی‌ژن‌ها یا آنتی‌بادی‌های خاص به سطح متصل می‌شوند. از جمله محدودیت‌های این روش، نیاز به وجود پروب‌های اختصاصی برای هر مولکول هدف و دانسیته پایین است که تنها امکان شناسایی دسته کوچکی از مواد را فراهم می‌کند. هم‌چنین، تغییرات پس از ترجمه با این روش مشخص نمی‌گردد(۲۱).

پروتئومیکس و *لیشمانیا*

مطالعات پروتئومیکی در زمینه *لیشمانیا*، دیدگاه‌های ارزشمندی را در شناسایی مولکول‌ها و مسیرهای درگیر در تمایز سلولی، اینتراکشن میزبان- انگل، و پاسخ سلول میزبان به عفونت را فراهم کرده است. در حالت کلی تحقیقات پروتئومیک در زمینه *لیشمانیا* را می‌توان به مطالعات پروفایل بیان پروتئین در روند تمایز پروماستیگوت‌ها به آماستیگوت در آزمایشگاه، مطالعات مقایسه‌ای پروفایل پروتئینی گونه‌های مختلف *لیشمانیا* در جهت شناخت هر چه بهتر بیولوژی و دوری گونه‌ها از یکدیگر، مقایسه پروفایل پروتئینی بیان شده در سلول‌های ماکروفاژی میزبان در اثر عفونت با *لیشمانیا* (گونه‌های مختلف) و هم‌چنین مطالعات پروتئومیک مقایسه ای پوست مبتلا به CL و پروتئین‌های سرم مبتلا به VL با افراد سالم دسته بندی کرد که به طور جداگانه و به تفصیل در مورد آن ها بحث می شود.

پروفایل بیان پروتئین در مراحل پروماستیگوت و آماستیگوت لیشمانیا با تکنولوژی پروتئومیکس

در طول چرخه زندگی انگل *لیشمانیا*، تمایز فرم پروماستیگوت به فرم اماستیگوت در اثر تغییرات محیطی از جمله افزایش دما، کاهش pH درون فاگولیزوزوم، افزایش گونه های فعال اکسیژن و نیتروژن و کمبود غذا، اتفاق می‌افتد(۲۲). سازگاری انگل به محیط میزبان (شامل دما و pH) و هم‌چنین محیط سیتوتوکسیک میزبان، برای بقا درون سلولی انگل مهم می باشد. این دو فرم انگل از لحاظ سطح mRNA ژن های مرتبط با ترجمه پروتئین‌ها، انتقال پیام و متابولیسم کربوهیدرات‌ها نیز دارای اختلاف می باشند(۲۳). تاکنون، درک کاملی از مکانیسم های سلولی- مولکولی درگیر در تمایز انگل *لیشمانیا* وجود ندارد. بنابراین، پروفایل پروتئوم انگل به طور گسترده برای مطالعات مقایسه‌ای میان مراحل مختلف *لیشمانیا* و شناسایی پروتئین‌های مختص هر مرحله که می‌تواند منجر به شناخت بهتر بیولوژی انگل شود، استفاده شده است. اکثر مطالعات پروتئومیکی بر روی گونه *لیشمانیا دونووانی* و *لیشمانیا اینفانتوم* به دلیل اهمیت پزشکی آن‌ها انجام شده است. اولین آنالیز

1. Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

پروتئومیکی برای مقایسه پروتئین‌های افتراقی *لیشمانیا اینفانتوم* به وسیله تکنیک الکتروفورز دو بعدی (2DE) انجام شده است و بیش از ۶۲ (۳ تا ۵ درصد لکه‌ها) پروتئین افتراقی در اماستیگوت های آکزنیک در میان حدود ۲۰۰۰ لکه پروتئینی تفکیک شده، تشخیص داده شد. دو پروتئین شناسایی شده به‌وسیله اسپکترومتری جرمی (MS)، شامل ایزوسیترات دهیدروژناز (IDH) موجود در چرخه کربس و تریوز فسفات ایزومراز (TIM) در مسیر گلیکولیتیک بودند. در مطالعه مذکور، فعالیت سه برابری آنزیم ایزوسیترات دهیدروژناز در فرم اماستیگوت نسبت به فرم پروماستیگوت مشاهده شد. از آن‌جایی که آنزیم موردنظر، تشکیل آلفا کتوگلوتارات را همراه با تولید NADPH کاتالیز می‌کند، فعالیت افزایش یافته آن با افزایش تقاضا برای آلفا کتوگلوتارات در دمای ۳۷ درجه درون سلولی قابل توجیه می‌باشد. آنزیم تریوز فسفات ایزومراز، آنزیم کلیدی در گلیکولیز می‌باشد که در اماستیگوت‌های *لیشمانیا اینفانتوم* فعالیت دو برابری نسبت به پروماستیگوت‌ها نشان داده است که می‌تواند به این دلیل باشد که آماستیگوت‌ها به منظور تولید ATP از طریق گلیکولیز درون سلول‌های میزبان، به سطح بالایی از فعالیت این آنزیم نیاز دارند. البته در زمان انجام مطالعه اشاره شد که ژنوم *لیشمانیا ماژور* در دسترس نبوده و شناسایی توالی آمینواسیدی به‌وسیله الگوریتم بلاست بر اساس همولوژی انجام شده است(۲۴). بعد از تکمیل و در دسترس قرار گرفتن ژنوم *لیشمانیا ماژور*، در مطالعه‌ی Nugent و همکاران، از ۱۴۷ لکه ی متمایز بیان شده در دو مرحله پروماستیگوت و اماستیگوت گونه *لیشمانیا مکزیکانا*، حدود ۴۷ پروتئین شناسایی شدند و نوع پروتئین‌های شناسایی شده نشان‌دهنده این مطلب بوده است که مسیر گلیکولیتیک در مرحله پروماستیگوت فعال‌تر است و این درحالی است که درمرحله اماستیگوت، این مسیر غیر فعال بوده و انگل از مسیر اکسیداسیون اسیدهای چرب و گلوکونئوژنز برای تامین انرژی استفاده می‌کند. همچنین، پروتئین‌هایی با تنظیم متفاوت از جمله پروتئین‌های مربوط به اعضای اسکلت سلولی، پاسخ به استرس، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و آمینو اسیدها و پروتئین‌های در ارتباط با سم‌زدایی، دلالت بر این نکته دارند که انگل‌های جنس *لیشمانیا* در طول تمایز، متحمل تغییرات متابولیکی مختلفی می‌شوند(۲۵). در مطالعه‌ای دیگر بر روی انگل *لیشمانیا دونووانی*، ۲۰۰۰ لکه پروتئینی بر روی ژل تفکیک شدند که حدود ۳۱ پروتئین منحصرا در مرحله پروماستیگوت حضور داشتند. در این مطالعه از تکنیک MALDI-TOF/MS استفاده شد و اکثر پروتئین‌های مورد شناسایی در فرم‌های پروماستیگوت و اماستیگوت متعلق به ۵ گروه پروتئینی با عملکردهای مشابه بوده‌اند که شامل، پاسخ به استرس سلولی، متابولیسم انرژی و فسفریلاسیون، چرخه سلولی و تکثیر سلول، متابولیسم آمینو اسیدها، غشای سلولی و اسکلت سلولی، می‌باشند. همچنین آنزیم‌های متابولیکی در اماستیگوت‌های آکزنیک در مقایسه با پروماستیگوت‌ها، دارای بیان بالاتری بوده‌اند(۲۶). در مطالعات مختلف نشان داده شده است که گروه عمده پروتئین‌ها که به‌طور انحصاری و یا به‌طور افزایشی در مرحله اماستیگوت بیان شده‌اند، درگیر در پروسه‌های پاسخ به استرس وفولدینگ پروتئینی بوده‌اند(۲۷،۲۵). در اولین مطالعه پروتئومیکی انجام شده برای ارزیابی تمایز آزمایشگاهی *لیشمانیا پانامنزیس*، ۷۵ پروتئین با بیان افتراقی تشخیص داده شد که از این تعداد، ۲۴ لکه پروتئینی منحصرا در اماستیگوت‌ها بیان شده بودند و ۵۱ لکه پروتئینی با حدود ۵-۱ برابر بیان بیش‌تر در مرحله اماستیگوت در مقایسه با پروماستیگوت بودند. از این میان، چند لکه پروتئینی دارای افزایش بیان در اماستیگوت‌ها با استفاده از اسپکترومتری جرمی شناسایی شدند که متعلق به خانواده پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs) بودند(۲۸). در تعدادی از مطالعات، پروفایل پروتئومیکی این دو مرحله مورد آنالیز قرار گرفته است و برخی پروتئین‌ها همانند سیستئین پروتئیناز b و SHERP در مرحله متاسیکلیک افزایش بیان نشان داده‌اند(۲۹). در مطالعه‌ای دیگر توسط Mojtahedi و همکاران در این زمینه، تفکیک پروتئین‌ها با روش الکتروفورز دو بعدی،

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

منجر به جداسازی ۱۲۰۰ لکه پروتئینی مربوط به هر کدام از مراحل متاسیکلیک و پروسیکلیک *لیشمانیا ماژور* گردید. از این میان ۱۹ ایزوفرم پروتئینی با بیان متمایز مورد بررسی بیش‌تر قرار گرفتند و پروتئین‌های دارای فعالیت سنتتیک (مثل RNA هلیکاز)، درمرحله متاسیکلیک دارای کاهش بیان بودند که در توافق و تایید کاهش عمومی بیان و سنتز پروتئین‌ها در طول تمایز این مرحله می‌باشد. از طرف دیگر پروتئین‌های درگیر در حرکت و جنبش انگل همانند پروتئین میله‌ای پارافلاژلار 1D و آلفا و بتاتوبولین در مرحله متاسیکلیک دارای افزایش بیان بوده اند که در توافق با تحرک بالای این فرم از انگل‌ها در مرحله عفونت‌زایی می‌باشند(۳۱،۳۰). اکثر مطالعات در زمینه تمایز مراحل مختلف چرخه زندگی گونه *لیشمانیا*، محدود به استفاده از روش الکتروفورز دو بعدی می‌باشند و Rosenzweig و همکاران در مطالعه‌ی خود با استفاده از روش iTRAQ، به مطالعه و آنالیز تغییرات بیان پروتئین در طول تمایز *لیشمانیا دونوانی* در مدل آکزنیک پرداخته‌اند(۳۲). در بسیاری از مطالعات پروتئومیک مقایسه‌ای جهت شناخت پروفایل پروتئومیکی مراحل مختلف تمایز *لیشمانیا*، محققان از فرم اماستیگوت آکزنیک در محیط کشت با pH و دمای مشابه محیط درون سلولی استفاده کرده‌اند. اگر چه اماستیگوت‌های آکزنیک می‌توانند برخی مارکرهای بیوشیمیایی فرم درون سلولی را ارائه دهند ولی دارای محدودیت‌هایی هم‌چون عدم دستیابی به فرم آکزنیک از همه گونه‌های *لیشمانیا* وجود دارد(۳۳). در سال‌های اخیر، پروفایل پروتئومیکی فرم اماستیگوت درون سلولی و پروماستیگوت برون سلولی گونه *لیشمانیا مکزیکانا* توسط Paape و همکاران با استفاده از الکتروفورز دو بعدی و MALDI-MS/MS مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعه مشخص گردید که *لیشمانیا مکزیکانا* در فرم اماستیگوت مقادیر زیادی پروتئین‌های بازی را بیان می کند که می‌توانند به عنوان عامل خنثی‌کننده محیط اسیدی درون فاگولیزوزوم و بار کلی محیط عمل کنند(۳۴). اخیرا در یک مطالعه، اماستیگوت‌های درون سلولی از ۳ کلون *لیشمانیا دونوانی* مختلف با استفاده از رویکرد iTRAQ برای آنالیز تغییرات بیانی پروتئین‌ها در طول تمایزشان، استفاده شده است. بسیاری از نتایج به دست آمده در این مطالعه با آن‌چه‌که توسط Rosenzweig و همکارن (۲۰۱۸) در مطالعه اماستیگوت‌های آکزنیک *لیشمانیا دونوانی* ارائه شده بود، مشابه بودند. برای مثال آنزیم‌های درگیر در گلوکونئوژنزیس، تنفس میتوکندریایی و پاسخ به استرس، دارای افزایش بیان در هر دو فرم اماستیگوت آکزنیک و اماستیگوت درون سلولی بودند و افزایش بیان پروتئین‌های مرتبط با ترافیک وزیکول‌ها در آماستیگوت‌ها مثل پروتئین‌های putative Rab7 و GTP binding protein، یافته جدیدی در این مطالعه بوده است. نتیجه‌گیری به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که به‌طور احتمالی، افزایش در میزان حمل و نقل وزیکولی برای بقای انگل درون فاگولیزوزوم به منظور کسب غذا و آزاد کردن متابولیت‌ها و فاکتورهای ویرولانس ضروری باشد(۳۵). پروماستیگوت‌های پروسیکلیک *لیشمانیا* به عنوان مدل در اکثر مطالعات استفاده شده‌اند که می‌توانند به دلیل کشت آسان آن‌ها در آزمایشگاه باشد. پروماستیگوت‌های متاسیکلیک، فرم عفونت‌زا برای میزبان مهره‌دار می‌باشند در حالی‌که اماستیگوت ها مسئول پاتوژنز بیماری هستند. نتایج ارائه شده در مطالعات مختلف نشان می‌دهد، بسیاری از مسیرهای متابولیک به‌طور متمایز و متفاوت در هر کدام از مراحل تکاملی انگل مورد نظر، تنظیم می‌شوند و در نتیجه پروتئین‌های مختلفی می‌توانند به عنوان اهداف درمانی در هر مرحله، مطرح شوند، اگر چه همچنان مجهولات زیادی در این زمینه وجود دارد. در نهایت می‌توان اشاره کرد که رویکردهای کمی پروتئومیکی همچون iTRAQ برای آنالیز پروفایل پروتئینی مراحل متاسیکلیک و اماستیگوت‌های درون سلولی، می‌تواند زمینه امید بخشی برای کشف مارکرهای ویرولانس جدید به شمار روند. تعدادی از مطالعات پروتئومیکی انجام شده در زمینه تمایز انگل در طول چرخه زندگی شان در جدول شماره ۱ به اختصار آورده شده است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

جدول شماره ۱: مطالعات پروتئومیکی پیشین انجام شده در زمینه آنالیز پروفایل پروتئومیکی مراحل مختلف چرخه زندگی گونه های مختلف انگل *لیشمانیا*

منابع	پروتئین های شناسایی شده	تکنیک مورد استفاده	مراحل مورد مطالعه	گونه مورد مطالعه
(24) Fakhry *et al.*,(2002)	از حدود ۲۰۰۰ پروتئین تفکیک شده، ۶۲ پروتئین در مرحله آماستیگوت دارای بیان متمایز بودند	2DE LC-MS/MS	آماستیگوت	*لیشمانیا اینفانتوم*
(36) Gongora *et al.*, (2003	۸۰۰ و ۱۵۰۰ لکه پروتئینی به ترتیب در گونه *گویانتریس* و *پاناماتریس* تفکیک شد	2DE LC-MS/MS	پروماستیگوت	*لیشمانیا گویانتریس (ویانیا)* *لیشمانیا پاناماتریس (ویانیا)*
(27) McNicoll *et al.*, (2006)	۲۲۰۰ لکه پروتئینی مشاهده شد که ۶/۱ درصد در پروماستیگوت و ۱۲/۴ درصد در مرحله آماستیگوت دارای افزایش بیان بودند	2DE-LC-MS/MS	پروماستیگوت و آماستیگوت	*لیشمانیا اینفانتوم*
(28) Walker *et al.*, (2006)	۷۵ پروتئین (درگیر در مسیر های متابولیسم کربوهیدرات ها، چرخه سلولی، پروتئین شوک حرارتی، پاسخ به استرس، متابولیسم اسید های آمینه، پروتئین های اسکلت سلولی)	2DE LC-MS/MS	پروماستیگوت و آگزنیک آماستیگوت	*لیشمانیا پاناماتریس*
(37) Brobey *et al.*,(2006)	۱۶۵۰ و ۱۵۳۰ لکه پروتئینی به ترتیب در *لیشمانیا آمازونتریس* و *لیشمانیا ماژور* تفکیک شد	2DE (pH= 3-10)	پروماستیگوت	*لیشمانیا آمازونتریس* *لیشمانیا ماژور*
(23) Leifso *et al.*, (2007)	بیش از ۹۴ درصد پروفایل بیان در *لیشمانیا ماژور* در دو مرحله یکسان بودند ۹۱ پروتئین در دو مرحله *لیشمانیا اینفانتوم* متفاوت بیان شده بودند	DNA microarray ICAT- 2DLC-ESI-MS/MS ICAT-2DLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS	- پروفایل بیان ژن مراحل پروماستیگوت و آماستیگوت -آنالیز پروتئومیک کمی ما ین مراحل پروماستیگوت و آماستیگوت	*لیشمانیا ماژور استرین فردلین* (MHOM/IL/80/Friedlin) *لیشمانیا اینفانتوم* (MHOM/MA/67/ITMAP263)
(30) Mojtahedi *et al.*, (2008)	توبولین آلفا و بتا، پروتئین پارافلاژلار میله ای 1D، RNA هلیکاز، زیرواحد بتا سوکسینیل کوآ سنتاز، زیرواحد ۴ سیتوکروم اکسیداز	2D-PAGE MALDI-TOF/MS	پروسیکلیک و متاسیکلیک (متا سیکلوژنزیس)	*لیشمانیا ماژور*
(38) Morales *et al.*, (2008)	فسفو پروتئوم در هر یک از مراحل شناسایی شد	IMAC 2-DE MALDI -MS/MS	پروماستیگوت و آماستیگوت	*لیشمانیا دونوانی*
(39) Yao (2010)	آنزیم های متابولیکی، GP63, GP46، انتقال دهنده پروتون	2DE, LC-MS/MS	پروسیکلیک و متاسیکلیک (متا سیکلوژنزیس)	*لیشمانیا اینفانتوم*
(40) Brotherton *et al.*,(2010)	۲۴۶۹ لکه پروتئین مشاهده شد پروتئین های افزایش بیان یافته در مرحله پروماستیگوت شامل: آنزیم های گلیکولیتیک و پروتئین های فلاژلار و مرحله آماستیگوت شامل: آنزیم های گلوکونئوژنزیس و بتا اکسیداسیون اسید های چرب	FFE, Alkaline- 2DE	پروتئین های بازی پروماستیگوت و آماستیگوت	*لیشمانیا اینفانتوم*
(41) Soleimanifard *et al.*,(2013)	۱۱ لکه پروتئینی در دو مرحله تفکیک شد. باند های ۲۲، ۲۸ و ۴۶ کیلو دالتون در مرحله پروماستیگوت و باند های ۱۲ و ۳۲ کیلو دالتونی در مرحله آماستیگوت حضور داشتند	SDS-PAGE	پروماستیگوت و آماستیگوت	*لیشمانیا ماژور*
(42) Hajjaran *et al.*,(2015)	۷۰۰ لکه پروتئینی تکرارپذیر در ژل ها تفکیک شد ۱۳۵ لکه پروتئینی دارای بیان متمایز در دو بافت مورد مطالعه بودند.	2DE LC-ESI-MS	مقایسه پروتئوم *لیشمانیا ترویکا* در دو بافت پوستی و احشایی	*لیشمانیا ترویکا*
(43) Hajjaran *et al.*,(2015)	۷۰۰ لکه پروتئینی تکرارپذیر در سه نمونه مورد مطالعه تفکیک شد ۲۶۴ لکه پروتئینی دارای بیان متمایز بودند.	2DE LC-ESI-MS	مرحله پروماستیگوت سه گونه *لیشمانیای* مورد مطالعه	*لیشمانیا ترویکا* *لیشمانیا ماژور* *لیشمانیا اینفانتوم*
(44) Kumar *et al.*,(2015)	۷۲ لکه پروتئینی مورد شناسایی شد	2DE-MALDI-TOF/TOF-MS	ساب- پروتئوم غنی شده غشا(MEPs)	*لیشمانیا دونوانی*

مطالعه مقاومت دارویی در لیشمانیا با استفاده از روش پروتئومیکس

در بیش از ۶۰ سال گذشته، پنتی والانت آنتی‌مونیال‌ها[1] (sbv) به عنوان خط اول درمان دارویی لیشمانیازیس محسوب می‌شوند. از حدود ۱۵ سال پیش، بیماران غیر پاسخ دهنده به این درمان و همچنین استرین‌های مقاوم انگل گزارش شده است(۴۵). در حال حاضر، مقاومت دارویی یک مسئله مهم در کشورهای هند و نپال به شمار می‌رود و این در حالی است که بیش از ۶۰ درصد بیماران به درمان با sbv پاسخ نمی‌دهند. این دارو برای عملکرد علیه *لیشمانیا*، ابتدا توسط انگل یا ماکروفاژ به فرم تری- والانت (sbIII) احیا می‌شود و sbv و فرم فعال‌تری- والانت آن می‌تواند با اهداف مورد نظر در انگل شامل تریپانوتیون ردوکتاز، گلوتاتیون سنتاز و آنزیم‌های زنجیره بتا اکسیدانت اسید چرب و مسیر گلیکولیتیک وارد واکنش شود(۴۶). آنتی‌مونیال می‌تواند منجر به فعال کردن مرگ برنامه ریزی شده در سلول (Apoptosis) شود که از طریق قطعه قطعه کردن ژنوم ارگانیسم، اتفاق می‌افتد(۴۷). با افزایش شیوع مقاومت به این خط درمانی، خط دوم دارویی شامل آمفوتریسین B، پنتامیدین، پاراموماییسین و داروی خوراکی Miltefosine برای درمان لیشمانیازیس در مناطق مختلف مورد استفاده قرار گرفت. در این میان، آنالیز پروتئومیکی استرین‌های مقاوم و مستعد می‌تواند در شناسایی اهداف درمانی جدید و سیر تکامل درمانی بسیار مفید واقع گردد(۴۸). آنالیز مقایسه‌ای با روش الکتروفورز دو بعدی گونه *لیشمانیا دونوانی* مقاوم به sbIII و بیماران کالاآزار مستعد در هند، نشان داد که پروتئین‌های مرتبط با تحریک مرگ سلولی در هر یک از استرین‌های حساس و مقاوم دارای تفاوت بیان می‌باشند(۴۹). در سال ۲۰۱۲، دو مطالعه در زمینه مقاومت دارویی در انگل *لیشمانیا*،

1. antimonials

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

انجام شده است. در یکی از این مطالعات Walker و همکاران، پروتئوم *لیشمانیا پانامنزیس (ویانیا)* مقاوم به sb^{III} در مرحله پروماستیگوت را با روش 2DE-LC-ES-MS/SMS مورد مطالعه قرار دادند و در نهایت ۹ فاکتور پروتئینی مقاوم به دارو که متعلق به دوگروه از پروتئین‌های پاسخ به استرس و آنزیم‌های متابولیکی بودند، را شناسایی کرده‌اند(۵۰). در مطالعه‌ای دیگر، استرین مقاوم و حساس *لیشمانیا تروپیکا* به داروی گلوکانتیم، توسط Hajjaran و همکارانش، از نظر پروفایل پروتئینی مورد مقایسه قرار گرفتند که پروتئین‌های LACK, PDI, alpha tubulin, PGf2-alpha synthase, vesicular transport protein, hypothetical protein به طور افتراقی بین دو استرین بیان شده بودند که هر یک از این پروتئین‌ها می‌توانند به عنوان اهداف بالقوه درمانی در مطالعات بعدی، بیش‌تر مورد آنالیز قرار گیرند(۵۱). در سال ۲۰۱۳، Brotherton و همکاران، لیشمانیا اینفانتوم مقاوم را با روش نوین پروتئومیک کمی[1] (SILAC)، مورد مطالعه قرار دادند که برای اولین بار با این روش، پروتئین ABC Transporter MRPA به عنوان مارکر مقاومت دارویی معرفی گردید(۵۲). در سال‌های اخیر نیز، Zarean و همکاران، پروتئوم ایزوله‌های مقاوم و حساس گونه *لیشمانیا ماژور* به داروی گلوکانتیم را با استفاده از روش الکتروفورز دو بعدی مورد آنالیز قرار دادند و از ۲۹۶۷ لکه پروتئینی تفکیک شده بر روی ژل با استفاده از آنالیز تصاویر ژل توسط نرم‌افزار Image Master 2D Melanie-6، ۸۹ لکه پروتئینی در ایزوله‌های مورد مطالعه، دارای بیان متفاوت بودند(۵۳). با توجه به مطالب ذکر شده در این مبحث، با شناسایی پروتئین‌های بیان شده در گونه‌های مقاوم و مقایسه آن‌ها با گونه‌های حساس، می‌توان تا حدودی در مورد مکانیسم ایجاد مقاومت نیز اظهار نظر کرد و معرفی اهداف درمانی جدید نیز امکانپذیر می‌گردد.

1. Stable isotope labeling with amino acids n cell culture

پروفایل پروتئین در زخم های لیشمانیوز پوستی

در سال‌های اخیر نتایج قابل توجه ای در ارتباط با لیشمانیوز پوستی با استفاده از پروتئومیک 2-DE و آنالیز شبکه بیولوژیکی برای پروفایل پروتئین‌های زخم پوستی در مقایسه با پروفایل بیان پروتئین نمونه‌های سالم پوستی، گزارش شده است. به‌طوری که، پروتئین‌های استخراج شده از نمونه‌های زخم و سالم، با استفاده از 2-DE تفکیک شده و ۱۵۰ لکه پروتئینی با بیان افتراقی بین دو حالت مورد مقایسه، گزارش شد. از این تعداد، ۹۵ پروتئین شناسایی شدند که ۲۹ لکه پروتئینی فقط در نمونه زخم لیشمانیوز پوستی و ۱۷ پروتئین در پوست نرمال بیان شده است. پروتئین‌های شناسایی شده با آنالیز اسپکترومتری جرمی، بر طبق عملکرد بیولوژیکی شان سازمان‌دهی شده و مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج آنالیز نشان داد که پروتئین‌های دارای افزایش بیان در بیوپسی زخم لیشمانیوز پوستی، در پروسه آپوپتوزیس (CASP-9)، پاسخ ایمنی (TRB) و بیوسنتتیک (BRF1) مشارکت داشتند(۵۴). در مطالعات قبلی نشان داده شدکه افزایش بیان TRB می‌تواند در فراخوانی سلول‌های T به محل عفونت، درگیر باشد لذا افزایش پروسه آپوپتوتیک و بیان CASPs می‌تواند نتیجه ایجاد پاسخ التهابی شدید باشد که به‌طور معمول در زخم‌های لیشمانیوز پوستی رخ می‌دهد(۵۵). همچنین برای درک بهتر تنظیم مسیرهای بیولوژیکی در افراد دارای عفونت لیشمانیایی، آنالیز شبکه بیولوژیکی اجرا شد. برای این منظور، شبکه‌ای از اینتراکشن‌های مابین پروتئین‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار cytoscape ترسیم گردید و شبکه پیچیده‌ای از ۵۰۵ گره (node) به دست آمد که شامل بسیاری از پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز شامل IL-23، TGFBR1، TNFR1، CASP-3، CASP-8 و GZMB بوده است و با استفاده از آنالیز مسیرهای بیولوژیکی IPA[2]، آپوپتوز با واسطه لنفوسیت‌های T، به عنوان مسیر اولیه فعال شده در سلول‌های هدف معرفی گردید. علاوه

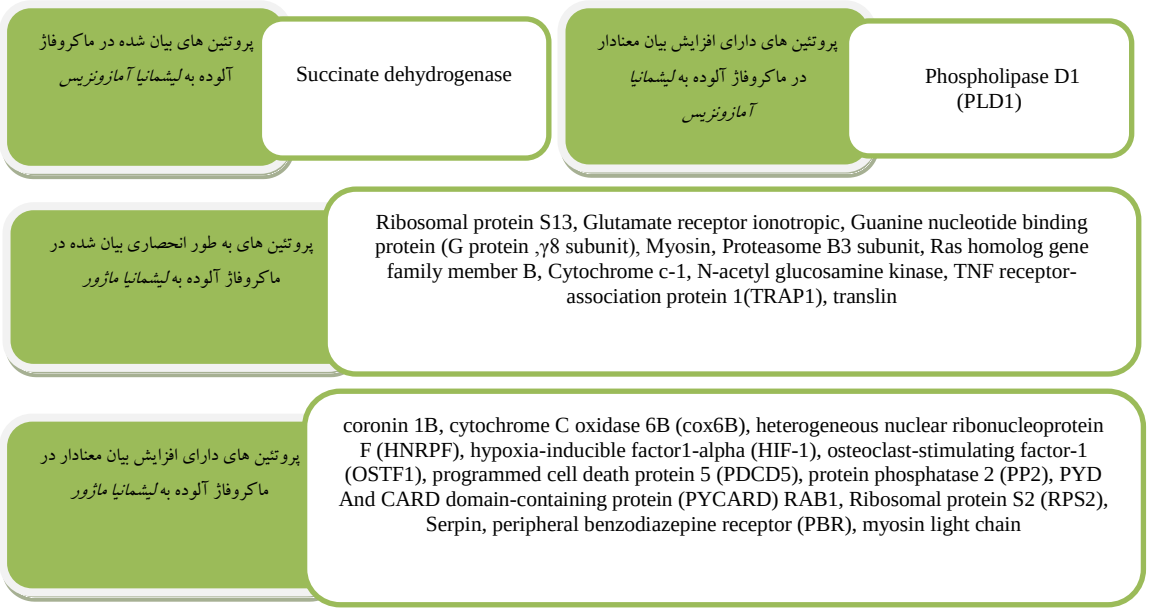
2. Ingenuity Pathway Analysis

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

بر این، محققان با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی، بیان افزایشی پروتئین های CASP-9، CASP-3 و گرانزیم B را در بیوپسی زخم لیشمانیوز پوستی در مقایسه با نمونه سالم، تایید کردند. هم‌چنین نشان دادند که بیان بالای این سه پروتئین با اندازه زخم در بیماران لیشمانیوز پوستی، رابطه مستقیم دارد و آپوپتوز به احتمال بالاتری در مکانیسم‌های مرتبط با پیشرفت آسیب بافتی قابل مشاهده در زخم‌های لیشمانیوز پوستی، مشارکت دارد(۵۴).

پروفایل بیان پروتئین در ماکروفاژ های انسانی آلوده به لیشمانیا با تکنولوژی پروتئومیکس

تاکنون با استفاده از روش پروتئومیک به منظور پروفایل کردن بیان پروتئین در سلول‌های میزبان (ماکروفاژ) در پاسخ به عفونت با انگل *لیشمانیا*، مطالعات اندکی منتشر شده است. سلول‌های ماکروفاژ موشی CBA برای مطالعه پروتئومیکی *لیشمانیا آمازونزیس* و *لیشمانیا ماژور* توسط Menezes وهمکاران مورداستفاده قرارگرفت. در مطالعه آن‌ها، تعداد ۱۳۵۲ پروتئین در هر دو دسته ماکروفاژهای آلوده و غیر آلوده به *لیشمانیا* و تعداد ۶۲ پروتئین به‌طور افزایشی در ماکروفاژهای آلوده (عفونی) بیان شد(۵۶). در این مطالعه، می‌توان به این نکته اشاره کرد که تنها ۱۰ پروتئین از تعداد ۶۲ پروتئین افتراقی، به‌طور انحصاری در ماکروفاژ آلوده به *لیشمانیا ماژور* بیان شده بودند. نتایج حاصل از این مطالعه در تصویر شماره ۲ به اختصار آورده شده است. از نتایج دیگر این مطالعه می‌توان اشاره کردکه پروتئین PLD1 دارای افزایش بیان قابل توجه‌ای در ماکروفاژ CBA آلوده به *لیشمانیا آمازونزیس* می‌باشد. این پروتئین بر روی فسفاتیدیل غشایی عمل می کند و پروتئین PLD1، باعث آزادسازی فسفاتیدیک اسید و ایجاد غشا جهت تشکیل فاگوزوم اولیه می گردد(۵۷). بنابراین محققان، افزایش بیان پروتئین PLD1 را در ماکروفاژ آلوده به *لیشمانیا آمازونزیس*، به دلیل مشارکت در تشکیل و حفظ واکوئل‌های پارازیتوفروس بزرگ که در عفونت درون سلولی با *لیشمانیا آمازونزیس* گزارش شده است، می‌دانند(۵۸). در مورد افزایش بیان پروتئین HIF-1α در سلول‌های آلوده به *لیشمانیا ماژور* می توان گفت که این افزایش در ارتباط با تولید بالاتر NO و بیان TNF-α در شرایط عفونت با *لیشمانیا* می‌باشد. این افزایش بیان HIF-1α در توافق با نتایج مطالعه دیگری می‌باشد که در آن افزایش دو برابری TNF-α در سلول آلوده به *لیشمانیا ماژور* نسبت به سلول آلوده به *لیشمانیا آمازونزیس* گزارش شده بود(۵۹).



تصویر شماره ۲: نتایج حاصل از مطالعه سلول های ماکروفاژ موشی CBA در مطالعه پروتئومیکی *لیشمانیا آمازونزیس* و *لیشمانیا ماژور* (2013) (۴۹)

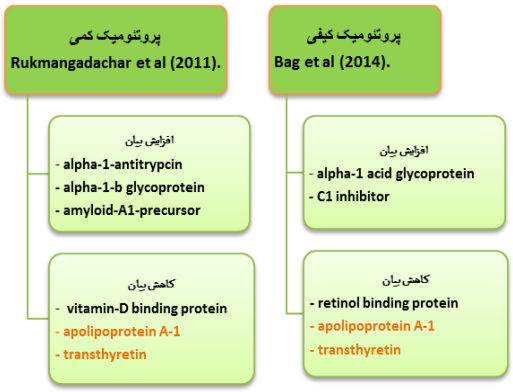
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

اخیرا در مطالعه، Singh و همکاران با استفاده از روش پروتئومیک کمی، پروفایل بیان پروتئین سلول THP-1 در پاسخ به عفونت با پروماستیگوت‌های *لیشمانیا دونووانی*، مورد آنالیز قرار گرفت و آنالیز پروتئومیکی، با روش iTRAQ-LC-MS/MS انجام شد. مقایسه پروفایل پروتئینی سلول THP-1 با سلول آلوده با *لیشمانیا دونووانی*، نشان‌دهنده افزایش بیان پروتئین‌های دخیل در مسیرهای متابولیک گلیکولیز و اکسیداسیون اسیدهای چرب، پروتئین های درگیر در رونویسی ژن، اسپلایسینگ RNA، هیستون‌ها، همانندسازی و ترمیم DNA، پروتئین‌های مسئول بقا سلولی و پیام‌رسانی سلولی در سلول آلوده به *لیشمانیا دونووانی*، بوده است. از نتایج قابل توجه این مطالعه می‌توان به افزایش پروتئین پیام‌رسان ضدویروسی میتوکندریایی (MAVS) در سلول آلوده به *لیشمانیا* اشاره کرد(۶۰). نتایج تمام مطالعات حاضر نشان می‌دهند که انگل *لیشمانیا*، پروتئوم سلول میزبان را در طول مراحل اولیه آلودگی تعدیل و تنظیم می‌کند که شواهدی مبنی بر ارتباط پیچیده مابین انگل و سلول میزبان در سطح مولکولی می‌باشد. هم‌چنین اهداف سلولی جدید بالقوه با توانایی تنظیم پاسخ سلولی را می توان مورد شناسایی قرار داد که می‌توانند در جهت کنترل عفونت *لیشمانیا* دارای کاربرد باشند.

پروفایل بیان پروتئین در سرم بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی با تکنولوژی پروتئومیکس

تا به امروز تعداد اندکی مطالعه جهت آنالیز پاسخ‌های التهابی ایمنی میزبان در برابر عفونت *لیشمانیا* انجام شده است. در سال‌های اخیر چندین مطالعه با روش‌های پروتئومیک برای شناسایی بیومارکرهای بالقوه درگیر در پاسخ ایمنی میزبان و هم‌چنین بیومارکرهای تشخیصی در سرم بیماران با لیشمانیوز احشایی گزارش شده است. در مطالعه Rukmangadachar و همکارانش، از روش پروتئومیک کمی برای مقایسه پروفایل پروتئینی شش بیمار مبتلا به لیشمانیوز احشایی و شش فرد کنترل استفاده گردید. در این مطالعه ۲۶ لکه پروتئین افتراقی شناسایی شد و از میان آن‌ها ۱۵ لکه با روش اسپکترومتری جرمی مورد آنالیز قرار گرفت که منجر به شناسایی پنج پروتئین مختلف شده است(۶۱).

درمطالعه دیگری، Bag وهمکاران، گلیکوپروتئین‌های پلاسما را با به کارگیری ستون کروماتوگرافی تمایلی لکتینی و سپس آنالیز اسپکترومتری جرمی (LC-MS) مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها ۳۹ لکه پروتئین افتراقی را شناسایی و گزارش کردند(۶۲). در هر دوی مطالعات اشاره شده در بالا، پروتئین‌های فاز حاد در سرم نمونه‌های بیمار و کنترل به طور متمایز بیان شده بودند که دلیل بر حالت سیستمیک بودن بیماری لیشمانیوز احشایی می‌باشد (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۳: نتایج مطالعات پروتئومیک کمی و کیفی انجام شده در مقایسه سرم بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی با سرم نمونه های کنترل

در مطالعات پیشین، افزایش میزان پروتئین alpha-1-acid glycoprotein در سرم افراد دارای زخم بافتی منتشر و هم‌چنین در طول عفونت و التهاب نشان داده شده است. هم‌چنین پروتئین مذکور در فعالسازی نوتروفیل‌ها، کموتاکسی و متابولیسم اکسیداتیو نیز مشارکت دارد(۶۳). بنابراین، افزایش میزان این پروتئین در سرم بیماران با لیشمانیوز احشایی را در نتیجه ی مهار فعالیت عملکرد نوتروفیل، تسهیل عفونت تب‌زا در پوست و سایر بافت‌ها می‌دانند. پروتئین افزایش بیان یافته دیگر در سرم افراد بیمار، پروتئین c1 inhibitor

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

می‌باشد. نتایج مطالعات فوق نشان دهنده کاهش میزان پروتئین transthyretin در سرم نمونه‌های بیمار می‌باشد که به عنوان حامل هورمون تیروئید است. هم‌چنین این پروتئین دارای فعالیت ضد التهابی بوده و موجب مهار تولید اینترلوکین-۱ در سلول های منوسیت و اپیتلیالی می‌شود(۶۴). لازم به ذکر است در مطالعه Yan و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نیز کاهش میزان بیان پروتئین transthyretin در سرم بیماران لیشمانیوز احشایی گزارش شده بود که در توافق با نتایج مطالعه پروتئومیکی مذکور می باشد(۶۵). پروتئین کاهش بیان یافته دیگر در سرم نمونه‌های بیمار، پروتئین retinol binding protein می‌باشد که در پلاسما با اتصال به پروتئین transthyretin، طی فیلتراسیون در بافت کلیه دفع نمی‌شود(۶۶). در نهایت می‌توان گفت که تعداد مطالعات پروتئومیکی انجام شده بر روی نمونه‌های سرم افراد مبتلا بسیار اندک می‌باشد و نیاز به مطالعات بیش‌تر در این زمینه احساس می‌شود.

بحث

رویکردها و روش‌های پروتئومیکی، ابزاری بسیار مفید جهت شناسایی پروتئین‌ها و مکانیسم‌های درگیر در جنبه‌های گوناگون بیولوژی انگل *لیشمانیا* می‌باشند. مطالعات پروتئومیکی مقایسه‌ای نشان داده‌اند که ارتباط ما بین انگل‌های *لیشمانیا* و میزبان در سطح مولکولی بسیار پیچیده می باشند. اکثر مطالعات پروتئومیکی انجام شده در حوزه *لیشمانیا* مربوط به مقایسه پروفایل پروتئینی مراحل مختلف تمایز انگل در طول چرخه زندگی اش می‌باشد که می‌تواند در زمینه آشکارسازی هر چه بیش‌تر مجهولات مربوط به بیولوژی انگل بسیار مفید و موثر باشد. لازم به ذکر است تاکنون هیچ کدام از اهداف مولکولی شناسایی شده با استفاده از روش‌های پروتئومیکی در جهت گسترش روش درمانی جدید و یا به عنوان مارکرهای پیش‌آگهی دهنده در بالین مورد استفاده قرار نگرفته اند. مقاله مروری حاضر می تواند در برنامه‌ریزی و هدایت مطالعات جدید برای درک بهتر پروتئین‌ها و مسیرهای درگیر در بقا درون سلولی انگل *لیشمانیا* مفید واقع شود. هم‌چنین تکنولوژی‌های جدید پروتئومیک به همراه ابزارهای بیوانفورماتیک و بانک‌های اطلاعاتی به‌منظور استخراج بهتر اطلاعات و تفسیر و بیان پروتئومیکی خصوصیات برجسته و منحصر، درون و بین گونه‌ای انگل‌ها ارزشمند می‌باشد. در نهایت می‌توان گفت که با توجه به گسترش روزافزون استفاده از تکنولوژی‌های اومیکی، استفاده از روش پروتئومیکس همزمان با روش‌هایی همانند ژنومیکس، متابولومیکس می‌تواند منجر به ایجاد داده‌های ارزشمند در مورد جنبه‌های مختلف بیماری و گشایش دیدگاه های جدید در جهت کنترل بیماری گردد.

سپاسگزاری

این مطالعه مروری با حمایت مرکز تحقیقات پروتئومیکس انجام گرفته و نویسندگان مقاله از اعضاء مرکز مربوطه بابت همکاری در این رابطه تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Ahmadi NA, Modiri M, Mamdohi S. First survey of cutaneous leishmaniasis in Borujerd county, western Islamic Republic of Iran. East Mediter Health J 2013; 19(10): 847-853.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PloS One 2012; 7(5): e35671.
3. Mauel J. Vaccination against Leishmania infections. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2002; 2(3): 201-226.
4. Zali H, Zamanian-Azodi M, Rezaei Tavirani MR, Baghban Akbar Zadeh A. Protein drug targets of lavandula angustifolia on treatment

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

of rat Alzheimer's disease. Iran J Pharm Res (IJPR) 2015; 14(1): 291-302 (Persian).

5. Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, Mortazavian A, Vafaee R, Rezaei-Tavirani M, Zali H, et al. Application of proteomics in cancer study. Am J Cancer Sci 2013; 2(2): 116-134.
6. Kalantari S, Rutishauser D, Samavat S, Nafar M, Mahmudieh L, Rezaei-Tavirani M, et al. Urinary prognostic biomarkers and classification of IgA nephropathy by high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography. PLoS One 2013; 8(12): e80830.
7. Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mole Biochem Parasitol 2007; 156(2): 93-101.
8. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. Nat Genet 2007; 39(7): 839-847.
9. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. Nature 2000; 405(6788): 837-846.
10. Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. Electrophoresis 2000; 21(6): 1037-1053.
11. Lopez MF, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton WF. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two- dimensional gels and identification by peptide mass profiling. Electrophoresis 2000; 21(17): 3673-3683.
12. Lauber WM, Carroll JA, Dufield DR, Kiesel JR, Radabaugh MR, Malone JP. Mass spectrometry compatibility of two- dimensional gel protein stains. Electrophoresis 2001; 22(5): 906-918.
13. Wu J, Lenchik NJ, Pabst MJ, Solomon SS, Shull J, Gerling IC. Functional characterization of two- dimensional gel- separated proteins using sequential staining. Electrophoresis 2005; 26(1): 225-237.
14. Lee WC, Lee KH. Applications of affinity chromatography in proteomics. Anal Bbiochem 2004; 324(1):1-10.
15. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. Science 1989; 246(4926): 64-71.
16. Veenstra TD. Electrospray ionization mass spectrometry: a promising new technique in the study of protein/DNA noncovalent complexes. Biochem Biophys Res Commun 1999; 257(1): 1-5.
17. Wu CH, Yeh L-SL, Huang H, Arminski L, Castro-Alvear J, Chen Y, et al. The protein information resource. Nucleic Acids Res 2003; 31(1): 345-347.
18. Laiko VV, Moyer SC, Cotter RJ. Atmospheric pressure MALDI/ion trap mass spectrometry. Analy Chem 2000; 72(21): 5239-5243.
19. Han DK, Eng J, Zhou H, Aebersold R. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. Nat Biotechnol 2001; 19(10): 946-951.
20. Shadforth IP, Dunkley TP, Lilley KS, Bessant C. i-Tracker: For quantitative proteomics using iTRAQ™. BMC Genomics 2005; 6(1): 145.
21. Siwy J, Vlahou A, Zimmerli L, Zürbig P, Schiffer E. Clinical proteomics: current techniques and potential applications in the elderly. Maturitas 2011; 68(3): 233-344.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

22. Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in Leishmania. Int J Parasitol 2007; 37(10): 1063-1075.
23. Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed. Mol Biochem Parasitol 2007; 152(1): 35-46.
24. El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in Leishmania infantum. Proteomics 2002; 2(8): 1007-10017.
25. Nugent PG, Karsani SA, Wait R, Tempero J, Smith DF. Proteomic analysis of Leishmania mexicana differentiation. Mol Biochem Parasitol 2004; 136(1): 51-62.
26. Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite Leishmania donovani. Proteomics 2003; 3(9): 1811-1829.
27. McNicoll F, Drummelsmith J, Muller M, Madore E, Boilard N, Ouellette M, et al. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in Leishmania infantum. Proteomics 2006; 6(12): 3567-3581.
28. Walker J, Vasques JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, Girard I, et al. Identification of developmentally-regulated proteins in Leishmania panamensis by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. Mol Biochem Parasitol 2006; 147(1): 64-73.
29. Knuepfer E, Stierhof YD, McKean PG, Smith DF. Characterization of a differentially expressed protein that shows an unusual localization to intracellular membranes in Leishmania major. Biochem J 2001; 356 (Pt 2): 335-344.
30. Mojtahedi, Z, Clos J, Kamali-Sarvestani E. Leishmania major: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. Exp Parasitol 2008; 119(3): 422-429.
31. Sacks, DL, Perkins PV. Identification of an infective state of Leishmania promastigotes. Science 1984; 223(4643): 1417-1419.
32. Rosenzweig D, Smith D, Myler PG, Olafson RW, Ziberstein D. Post-translational modification of cellular proteins during Leishmania donovani differentiation. Proteomics 2008; 8(9): 1843-1850.
33. Holzer TR, McMaster WR, Forney JD. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in Leishmania mexicana. Mol Biochem Parasitol 2006; 146(2): 198-218.
34. Paape D, Lippuner C, Schmid M, Ackermann R, Barrios-Lierena ME, Zimny-Arndt U, et al. Transgenic, fluorescent Leishmania mexicana allow direct analysis of the proteome of intracellular amastigotes. Mol Cell Proteomics 2008; 7(9): 1688-1701.
35. Biyani N, Madhubala R. Quantitative proteomic profiling of the promastigotes and the intracellular amastigotes of Leishmania donovani isolates identifies novel proteins having a role in Leishmania differentiation and intracellular survival. Biochim Biophys Acta 2010; 1824(12): 1342-1350.
36. Gongora R, Nathalie A, Manfredo Q, Nicolas F, Nancy GS, Walker J. Mapping the proteome of Leishmania Viannia parasites using two-dimensional polyacrylamide gel

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

electrophoresis and associated technologies. Revista Biomedica 2003; 23(2): 153-160.

37. Brobey RK, Mei FC, Cheng X, Soong L. Comparative two-dimensional electrophoresis maps of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. Braz J Infect Dis 2006; 10(1): 1-6.
38. Morales MA, Watanabe R, Laurent C, Lenormand P, Rousselle JC, Nomane A, et al. Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. Proteomics 2008; 8(2): 350-363.
39. Yao C. Major surface protease of trypanosomatids: one size fi ts all? Infect Immun 2010; 78(1): 22-31.
40. Brotherton MC, Racine G, Foucher AL, Drummelsmith J, Papadopoulou B, Ouellette M. Analysis of stage-specific expression of basic proteins in *Leishmania infantum*. J Proteome Res 2010; 9(8): 3842-3853.
41. Soleimanifard S, Arjmand R, Hejazi SH. Investigation and Comparison of Leishmania major Promastigote and Amastigote Protein Content by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Sci J Hamadan Univ Med Sci 2013; 20(1): 1-8 (Persian).
42. Hajjaran H, Mousavi P, Burchmore R, Mohebali M, Bazargani MM, Salekdeh GH, et al. Comparative proteomic profiling of *Leishmania tropica*: Investigation of a case infected with simultaneous cutaneous and viscerotropic leishmaniasis by 2-Dimentional Electrophoresis and Mass Spectrometry. Iran J Parasitol 2015; 10(3): 366-380 (Persain).
43. Hajjaran H, Bazargani MM, Mohebali M, Burchmore R, Salekdeh GH, Kazemi-Rad E, et al. Comparison of the Proteome Profiling of Iranian isolates of *Leishmania tropica*, *L. major* and *L. infantum* by Two- Dimensional Electrophoresis (2-DE) and Mass-spectrometry. Iran J Parasitol 2015; 10(4): 530-540 (Persian).
44. Kumar A, Misra P, Sisodia B, Shasany AK, Sundar S, Dube A. Proteomic analyses of membrane enriched proteinsof *Leishmania donovani* Indian clinical isolate by mass spectrometry. Parasitol Int 2015: 64(4): 36-42.
45. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1): 111-126.
46. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen Leishmania donovani. J Biol Chem 2004; 279(38): 39925-39932.
47. Sudhandrian G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca2+ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular Leishmania donovani amastigotes. J Biol Chem 2003; 278(27): 25120-25132.
48. Cuervo P, Jesus JBD. Genetic expression and drug resistance, the role of proteomics, in Drug Resistance in Leishmania Parasites. Springer-Verlag Wien; 2013, 215-236.
49. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummelsmith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in Leishmania donovani clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. Mol Cell Proteomics 2007; 6(1): 88-101.
50. Walker J, Gngora R, Vasquez JJ, Drummelsmith J, Burchmore R, Roy G, et al. Discovery of factors linked to antimony resistance in Leishmania panamensis through differential proteome analysis. Mol Biochem Parasitol 2012; 183(2): 166-176.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

51. Hajjaran H, Azarian B, Mohebali M, Hadighi R, Assareh A, Vaziri b. Comparative proteomics study on meglumine antimoniate sensitive and resistant Leishmania tropica isolated from Iranian anthroponotic cutaneous leishmaniasis patients/Étude protéomique comparative de souches Leishmania tropica sensibles ou résistantes à l'antimoniate de méglumine chez des patient's iraniens atteints de leishmaniose cutanée anthroponotique. East Mediterr Health J 2012; 18(2): 165-171.
52. Brotherton MC, Barassa S, Philippe L, Danielle L, Guy GP, Arnaud D, et al. Proteomic and genomic analyses of antimony resistant Leishmania infantum mutant. PLoS One 2013; 8(11): e81899.
53. Zarean M, Maraghi S, Hajjaran H, Mohebali M, Feiz-Hdad MH, Assarehzadegan MA. Comparison of Proteome Profiling of Two Sensitive and Resistant Field Iranian Isolates of Leishmania major to Glucantime® by 2-Dimensional Electrophoresis. Iran J Parasitol 2015; 10(1): 19-29 (Persian).
54. Silva Santos Cd, Attarha S, Saini RK, Boaventura V, Costa J, Khouri R, et al. Proteome profiling of human cutaneous leishmaniasis lesion. J Invest Dermatol 2015; 135(2): 400-410.
55. Keesen TS, Antonelli LR, Faria DR, Guimaraes LH, Bacellar O, Carvalho EM, et al. CD4+ T cells defined by their Vβ T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. Clin Exp Immunol 2011; 165(3): 338-351.
56. Menezes JP, Almeida TF, Petersen AL, Guedes CE, Mota MS, Lima JG, et al. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. Microbes Infect 2013; 15(8): 579-591.
57. Wang L, Cummings R, Usatyuk P, Morris A, Irani K, Natarajan V. Involvement of phospholipases D1 and D2 in sphingosine 1-phosphate-induced ERK (extracellular-signal-regulated kinase) activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. Biochem J 2002; 367(3): 751-760.
58. Antoine JC, Prina E, Lang T, Courrent N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. Trends microbiol 1998; 6(10): 392-401.
59. Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, et al. Type 1 interferon (IFNα/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. Immunity 1998; 8(1): 77-87.
60. Singh AK, Pandey RK, Sigueira-Neto JL, Kwon YJ, Freitas-Junior LH, Shaha C, et al. Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to Leishmania donovani over an early temporal window. Infect Immune 2015; 83(5): 1853-1868.
61. Rukmangadachar LA, Kataria J, Hariprasad G, Samantaray JC, Srinivasan A. Two-dimensional difference gel electrophoresis (DIGE) analysis of sera from visceral leishmaniasis patients. Clin proteomics 2011; 8(1): 4.
62. Bag AK, Saha S, Sundar S, Saha B, Chakrabarti A, Mandal C. Comparative proteomics and glycoproteomics of plasma proteins in Indian visceral leishmaniasis. Proteome Sci 2014; 12(1): 48.
63. Pucadyil TJ, Tewary P, Madhubala R, Chattopadhyay. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

leishmaniasis. Mol Biochem Parasitol 2004; 133(2): 145-152.

64. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, et al. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G- 250 staining for proteome analysis. Electrophoresis 2004; 25(9): 1327-1333.
65. Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix- assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization- mass spectrometry. Electrophoresis 2000; 21(17): 3666-3672.
66. Friedman DB, Wang SE, Whitwell CW, Caprioli RM, Arteage CL. Multivariable Difference Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry A Case Study on Transforming Growth Factor-β and ERBB2 Signaling. Mol Cell Proteomics, 2007; 6(1): 150-169.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]